

# 几种无机离子和氨基酸对酿酒酵母酒精耐性的影响

梁泽新<sup>1</sup>, 王川<sup>2</sup>, 戴川<sup>1</sup>

(1. 泸州老窖集团泸州酒业集中发展区有限公司, 四川 泸州 646000;

2. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000)

**摘要:**研究了几种无机离子和氨基酸对酿酒酵母的生长和发酵的乙醇耐性的影响。结果表明, 镁离子和锌离子都能提高酵母菌在乙醇存在下的生物量, 并增加发酵的酒精度和缩短发酵时间; 镁离子作用强于锌离子; 钙离子对酵母菌生长的乙醇耐性有促进作用, 但高浓度的钙离子对酵母菌生长有抑制作用; 钙离子对发酵的乙醇耐性无影响; 甘氨酸和脯氨酸对酵母菌生长的乙醇耐性无影响, 但能提高酵母菌发酵的酒精度和缩短发酵时间, 而谷氨酸则显示相反的结果。无机离子和氨基酸对酵母菌的生长和发酵的乙醇耐性体现不一致的效果表明酵母菌的生长和发酵的乙醇耐性机制不同。

**关键词:**无机离子; 氨基酸; 酵母; 酒精耐性

**中图分类号:**TS201.3

**文献标志码:**A

## 引言

人类利用酿酒酵母发酵糖类生产酒精已有数千年历史, 到目前为止, 酵母已被广泛利用在食品、化工、保健和生物医学等各种领域。酿酒酵母具有发酵速度快, 产生酒精浓度高的优点, 但高浓度的酒精会对酵母菌产生毒害作用, 抑制其生长并进而影响酒精的产生。在长期的进化和人工培育下, 酵母已具有了和别的微生物所没有的酒精耐性, 这使得酵母的酒精耐性及其机理成为酵母研究的热点。研究表明, 酵母菌耐酒精的生化机理十分复杂, 菌株的特异性、细胞的调控基因、细胞中的多种组份以及培养基营养成分都与酵母菌耐酒精能力有密切的关系, 这方面已获得了大量的研究成果<sup>[1-6]</sup>, 但有些具体的生化机理还未弄清。无机离子和氨基酸作为酶的辅助因子和氮源广泛参与酵母的代谢过程, 但与酵母酒精耐性的关系还研究较少, 本文通过在培养基添加几种无机离子和氨基酸对酿酒酵母 1308 在生长和发酵的酒精耐性的影响, 对酿酒酵母的酒精耐性机理做进一步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

酿酒酵母 1308(*Saccharomyces cerevisiae*)。

#### 1.1.2 培养基

YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20。

生长培养基(g/L): 葡萄糖 30, 酵母提取物 10, 蛋白胨 3。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 250, 酵母抽提物 3, 蛋白胨 3。

#### 1.1.3 试剂

MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, 甘氨酸, 脯氨酸, 谷氨酸, 均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 无机离子对酵母菌乙醇耐性影响

将酵母菌接于 YPD 斜面培养基活化 48 h, 然后接种

收稿日期:2015-01-08

基金项目:四川省星火计划中小企业科技成果转化平台建设项目(14C26245102975)

作者简介:梁泽新(1970-), 男, 四川泸州人, 硕士生, 主要从事微生物及生物产品分离方面的研究, (E-mail)liangzx@lzlj.com

在 50 mL 生长培养基中的以 30 °C 150 rpm 培养至指数期,转移接种至含 5% 乙醇的生长培养基中,生长培养基中分别加入不同浓度的  $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $ZnSO_4$ ,以不加无机离子为对照,30 °C 150 rpm 培养 48 h,测定菌体生物量,生物量测定方法采用干重法,参照文献[7]测定菌液在 610 nm 的光密度。

另在发酵培养基中分别加入一定浓度的  $MgSO_4$  (5 mmol/L),  $CaCl_2$  (1 mmol/L),  $ZnSO_4$  (0.5 mmol/L), 30 °C 150 rpm 发酵,以不加无机离子的为对照,测定发酵结束的酒精度和发酵时间。

### 1.2.2 氨基酸对酵母菌乙醇耐性影响

将酵母菌接于 YPD 斜面培养基活化 48 h,然后接种在 50 mL 生长培养基中的以 30 °C 150 rpm 培养至指数期,转移接种至含 5% 乙醇的生长培养基中,生长培养基中分别加入不同浓度甘氨酸,脯氨酸,谷氨酸,以不加氨基酸子为对照,30 °C 150 rpm 培养 48 h,测定菌体生物量。

另在发酵培养基中分别加入 20 mmol/L 的甘氨酸,脯氨酸,谷氨酸,30 °C 150 rpm 发酵,以不加氨基酸的为对照,测定发酵结束酒精度和发酵时间。酒精度测定方法参照文献[8]进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 无机离子对酵母菌乙醇耐性的影响

在含有 5% 乙醇的酵母生长培养基中分别添加不同浓度的  $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$  和  $ZnSO_4$  培养 48 h 之后测定菌体生物量,结果如图 1 所示。在添加 5% 乙醇条件下,酵母生长的细胞量随镁离子浓度增加而增加,添加镁离子的最适浓度范围在 0.2 ~ 10 mmol/L,表明镁离子能提高酵母菌生长时的乙醇耐性。钙离子对酵母的生长有一定的促进作用,在低浓度下,酵母生长与钙离子浓度正相关,在 0.5 ~ 2 mmol/L 浓度下,钙离子浓度的增加能促进酵母的生长,但超过 2 mmol/L 后,钙离子浓度的增加反而会抑制酵母生长。锌离子对酵母的生长也呈现为促进作用,而且在很低的浓度 (0.02 mmol/L) 下就促进酵母生长,但在达到高浓度时,对酵母生长的影响逐渐变小。

通过在培养基中添加三种最适浓度离子条件下对酵母进行发酵,结果如图 2 所示。与对照相比,镁离子能够使酵母发酵产生更高的酒精度 (85.4 g/L),并能缩短发酵时间 (65 h)。锌离子也能够使酵母发酵产生更高的酒精度 (75.4 g/L),并缩短发酵时间 (77 h),镁离子和锌离子对酵母发酵的影响显示出了和酵母菌生长

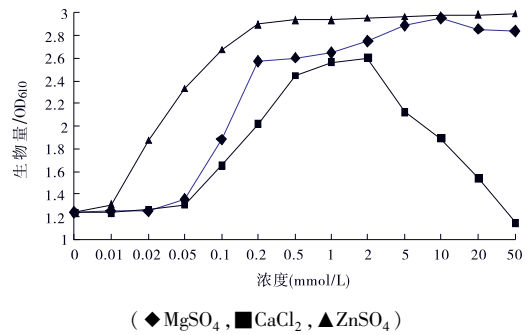


图 1 无机离子对酵母生长酒精耐性的影响

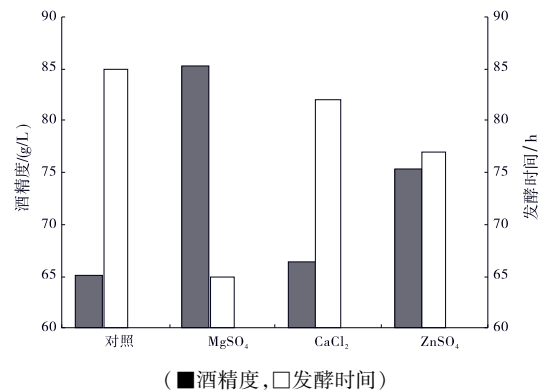


图 2 无机离子对酵母发酵酒精耐性的影响

与乙醇耐性一致的结果。而钙离子对酵母发酵的乙醇耐性影响不大,没有显示出和生长、乙醇耐性一致的结果。因此,在对酵母生长和发酵的乙醇耐性上,几种离子的效应比较为:镁离子 > 锌离子 > 钙离子。

### 2.2 氨基酸对酵母耐乙醇性的影响

在酵母菌生长培养基中分别添加不同浓度的氨基酸,培养 48 h 之后测定菌体生物量,结果如图 3 所示。结果表明,在培养基中添加甘氨酸和脯氨酸时,酵母在 5% 酒精存在下的生长与没有添加时变化不大,表明甘氨酸和脯氨酸不能增加酵母的生物量,不能提高酵母生长的乙醇耐性。但培养基中加入谷氨酸能使酵母在 5% 酒精存在下提高生物量,且与谷氨酸浓度成正比,表明谷氨酸能提高酵母生长的乙醇耐性。

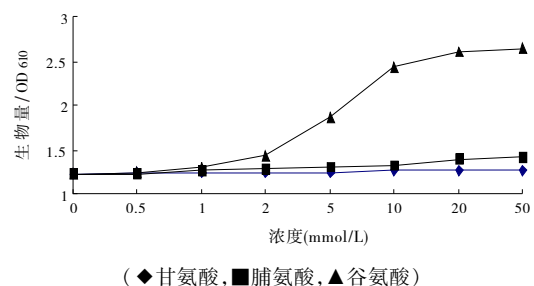


图 3 氨基酸对酵母生长酒精耐性的影响

在发酵培养基中添加一定浓度的三种氨基酸进行发酵,结果如图 4 所示,与对照相比 (65.2 g/L, 65 h),甘

氨酸和脯氨酸都能够使酵母发酵菌产生更高的酒精度(分别为 72.5 g/L 和 77.2 g/L),并能缩短发酵时间(分别为 75 h 和 70 h)。表明甘氨酸和脯氨酸能提高酵母发酵的乙醇耐性,并且脯氨酸作用强于甘氨酸。但谷氨酸在提高酵母发酵酒精度方面效果不显著(67.3 g/L, 82 h),不能提高酵母发酵时的乙醇耐性。以上结果也说明,三种氨基酸对酵母酒精耐性的影响在生长和发酵方面没有显示出一致性的影响。

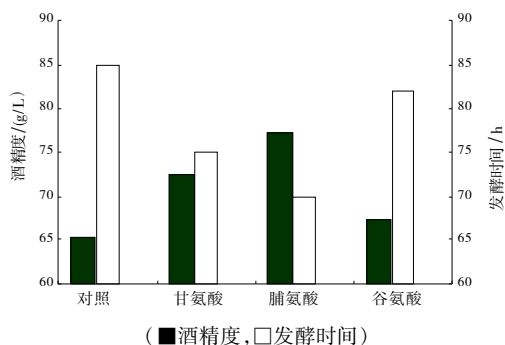


图 4 氨基酸对酵母发酵酒精耐性的影响

### 3 讨论

酵母菌的乙醇耐性受到基因、细胞膜组分和营养成分等多种因素的影响,其中培养基中的营养成分被认为对酵母菌的乙醇耐性影响较大。酵母糖代谢的多种合成酶和激酶以及 DNA 复制、转录和翻译的酶活性都需要镁离子的参与,因此镁离子的加入能提高酵母在生长和发酵方面的乙醇耐性,已有的报道均表明镁离子能缩短酵母滞后期、增加细胞数目和乙醇产量<sup>[9-10]</sup>,本研究中的镁离子对酵母的酒精耐性呈现相同的效应,并在较宽的浓度范围内提高了酵母的生长和发酵的乙醇耐性。钙离子在保护酵母的细胞膜结构方面发挥作用,也能提高酵母的热稳定性<sup>[10-11]</sup>,因此,在生长和发酵培养基中加入钙离子也能提高酵母的乙醇耐性。本研究中加入的钙离子在低浓度下能促进酵母在乙醇存在下的生长,但与已有报道不同之处在于高浓度的钙离子会抑制酵母生长,而且钙离子对酵母的发酵的乙醇耐性无影响。原因可能在于钙离子对酵母的效应具有菌株特异性,其次,升高的钙离子浓度会抑制一些依赖于镁离子的酶活性,从而使得酵母的生长和发酵受到不利影响。锌离子是维持乙醇脱氢酶活力所必需的,同时也能保持酵母细胞膜结构的稳定,使膜流动性下降<sup>[12-13]</sup>。本研究中加入锌离子能提高酵母生长和发酵乙醇耐性的结果与多数报道一致,不同之处在于锌离子在低含量下对酵母的乙醇耐性效应有所不同,这可能表明锌离子对酵母的酒精

耐性影响具有菌株依赖性。

几种氨基酸对酵母的酒精耐性的影响有所不同,其中甘氨酸和脯氨酸对酵母的生长无影响,能促进酵母的发酵乙醇耐性,其中脯氨酸作用大于甘氨酸。而谷氨酸能促进酵母的生长,但对酵母的发酵影响不大。有关氨基酸对酵母的影响方面的研究报道了一些互不相同的结论<sup>[14-16]</sup>,甘氨酸和脯氨酸由于结构的特殊,其代谢产生的碳骨架难以为酵母所利用,因此通常不是作为酵母生长的氮源,但甘氨酸和脯氨酸可以作为酵母的渗透压保护剂<sup>[16-17]</sup>,因此体现出对酵母发酵时能提高乙醇浓度,增强酵母的乙醇耐性。谷氨酸是酵母氨基酸合成途径的中心,利用率较高,因此能促进酵母在乙醇存在下的生长,但谷氨酸对发酵耐乙醇性的影响不显著,已有的报道表明谷氨酸能够减少发酵副产物甘油的形成<sup>[15]</sup>,从而间接提高乙醇产量。

本文研究了无机离子和氨基酸单因素对酵母菌乙醇耐性的影响效应,而酵母菌的乙醇耐性还与酵母的菌株类型以及与各影响因素相互之间的作用方式和组合水平也有关系,这使得酵母菌的乙醇耐性机制十分复杂,因此还应通过进一步研究这些无机离子、氨基酸和其他的抗乙醇组分之间的作用和组合,才能更好的了解酵母菌的乙醇耐性机制。

### 参考文献:

- [1] Stanley D, Bandara A, Fraser S, et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(1): 13-24.
- [2] 池振明, 高峻. 酵母菌耐酒精机制的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 1999, 26(5): 372-376.
- [3] Fang H, Li H. The roles of trehalose and heat shock proteins for enhancing ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *China Biotechnology*, 2014, 34(6): 84-89.
- [4] Ma M, Liu Z L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3): 829-845.
- [5] Pais T M, Foulquié-Moreno M R, Hubmann G, et al. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast [J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(6): 1-18.
- [6] Yang K M, Lee N R, Woo J M, et al. Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(6): 675-684.
- [7] Albers E, Larsen C, Liden G, et al. Influence of the

- Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* Anaerobic Growth and Product Formation[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(9): 3187-3195.
- [8] 陈荣凯. 白酒酒精度测定误差分析及处理[J]. 科技资讯, 2014(1): 222-224.
- [9] Birch R M, Walker G M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 26(9): 678-687.
- [10] 胡纯铿, 白凤武, 安利佳.  $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  对自絮凝颗粒酵母耐酒精性能的影响及作用机制的比较研究[J]. 高校化学工程学报, 2004, 18(2): 179-184.
- [11] Rises E M, Stewart G G. The Effects of increased magnesium and calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity wort[J]. Inst. Brew., 1997, 9(103): 287-291.
- [12] Zhao X Q, Bai F W. Zinc and yeast stress tolerance: micronutrient plays a big role[J]. J Biotechnol., 2012, 158(4): 176-183.
- [13] Zhao X Q, Xue C, Ge X M, et al. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation[J]. J Biotechnol., 2009, 139(1): 55-60.
- [14] Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(5): 1519-1524.
- [15] Kolothumanni C, Ingledew W M. Fuel Alcohol Production: Effects of Free Amino Nitrogen on Fermentation of Very-High-Gravity Wheat Mash[J]. Appl Environ Microbiol., 1990, 56(7): 2046-2050.
- [16] Hu C K, Bai F W, An L J. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating mutant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(5): 809-813.
- [17] Takagi H. Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(2): 211-223.

## The Effect of Several Inorganic Ions and Amino Acids on the Ethanol Tolerance of *Saccharomyces Cerevisiae*

LIANG Zexin<sup>1</sup>, WANG Chuan<sup>2</sup>, DAI Chuan<sup>1</sup>

(1. Luzhou Distillery Industry Concentration Development Zone Co., Ltd. of Luzhou Laojiao Group Company, Luzhou 646000, China; 2. School of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

**Abstract:** The effect of several inorganic ions and amino acids on the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the aspects of cell growth and fermentation has been studied. The results show as follows: by addition of the magnesium ion and zinc ion in the culture medium, the biomass of *S. cerevisiae* in the presence of alcohol is improved, alcohol content of fermentation is increased and the fermentation time is shortened, while the magnesium ion exhibits the stronger effect than zinc ion. The calcium ion can improve the ethanol tolerance of *S. cerevisiae* in its growth, but the inhibition effect on the growth of *S. cerevisiae* appears by the addition of high concentration of calcium ion. The calcium ion offered almost no effect on the ethanol tolerance of fermentation. The addition of proline and glycine shows no effect on the ethanol tolerance of the *S. cerevisiae* growth, but increases the ethanol content and shortens the fermentation time. While, the addition of glutamic acid displays the opposite result. The inconsistent results of ethanol tolerance of *S. cerevisiae* growth and fermentation, exhibited by the addition of inorganic ions and amino acids, indicate that the mechanism of ethanol tolerance of *S. cerevisiae* is different in the aspects of cell growth and fermentation.

**Key words:** inorganic ion; amino acid; *Saccharomyces cerevisiae*; ethanol tolerance